

# Ornithine transcarbamylase (OTC) 효소결핍증, 수포성 표피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소결핍증 가계에서의 정상아 임신 및 출산

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실, \*산부인과학교실

<sup>†</sup>울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아과학교실

<sup>‡</sup>연세대학교 의과대학 피부과학교실 피부생물학연구소

이형송 · 최혜원 · 임천규 · 민동미 · 변혜경 · 김진영\* · 궁미경\*

유한옥<sup>†</sup> · 김수찬<sup>‡</sup> · 전진현 · 강인수\*

=ABSTRACT=

## Successful Preimplantation Genetic Diagnosis for Ornithine Transcarbamylase Deficiency, Junctional Epidermolysis Bullosa and Lactic Acidosis Using Duplex Nested PCR: Delivery of Healthy Baby by Specific Preimplantation Genetic Diagnosis for Ornithine Transcarbamylase Deficiency

Hyoun-Song Lee, M.S., Hye Won Choi, B.S., Chun Kyu Lim, M.S.,  
Dong Mi Min, M.S., Hye Kyung Byun, M.S., Jin Young Kim, M.D.\*,  
Mi Kyoungh Koong, M.D.\*, Han-Wook Yoo, M.D.<sup>†</sup>, Soo-Chan Kim, M.D.<sup>‡</sup>,  
Jin Hyun Jun, Ph.D., Inn Soo Kang, M.D.\*

*Laboratory of Reproductive Biology and Infertility,*

*\*Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital,*

*Sungkyunkwan University School of Medicine,*

*<sup>†</sup>Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine,*

*<sup>‡</sup>Department of Dermatology and Cutaneous Biology Institute,*

*Yonsei University College of Medicine*

**Objective :** Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is reserved for couples with a risk of transmitting a serious and incurable disease, and hence avoids the undesirable therapeutic abortion. Herein, we report the result of PGD to carriers at risk of transmitting ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, junctional epidermolysis bullosa (EB) and lactic acidosis (LA) due to defect of pyruvate dehydrogenase  $\alpha 1$  gene, respectively.

**Methods :** The ovarian stimulation, oocyte retrieval and ICSI procedure were undergone by conventional protocols. PGD for single gene disorders was carried out after biopsy of one or two blastomeres from the embryos on the third day. We performed the duplex nested PCR of the simultaneous amplification for the causative mutation loci as well as the SRY gene on Y chromosome in case of OTC deficiency and LA. Two different mutation loci of *ITGB4* gene in EB case were amplified by the same protocol. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, restriction fragment length polymorphism analysis or direct DNA sequencing.

**Results :** A total of 26 embryos were analyzed by duplex nested PCR. One or two blastomeres were biopsied, and successful diagnosis rate of PGD with PCR was 92.3% (24/26). There was no contamination in all PCR samples of negative controls (n=67). Five embryos (19.2%) were diagnosed as normal embryos, which were transferred to the mothers' uterus in each cases. In OTC deficiency case, singleton pregnancy was established. At 17 weeks of gestation, genetic normality of *OTC* gene in fetus was confirmed by amniocentesis. A healthy baby was successfully delivered at 36 weeks of gestation in OTC deficiency case. Unfortunately, pregnancies were not achievement in cases of EB and LA.

**Conclusion :** This is the first report in Korea that healthy baby was born after specific PGD for OTC deficiency. Our results demonstrate that duplex nested PCR for single cell is an efficient method in identifying the gender and single gene mutation or two different mutation loci, simultaneously. This PGD procedure could provide normal healthy baby to the couple with a high risk of transmitting genetic diseases.

**Key Words :** Single gene disorder, Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Ornithine transcarbamylase deficiency, Epidermolysis bullosa, Lactic acidosis

최근 인간의 체외수정 및 배아이식술 분야에서, 유전적으로 결함이 있는 환아를 출산할 확률이 높은 부부에게서 정상아를 출산할 수 있는 기회를 제공하기 위해서 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 방법이 도입, 적용되고 있다. 이러한 착상전 유전진단은 배아이식 전에 비정상적인 배아의 이식을 배제하기 위한 산전 진단의 한 가지 형태로 여러 가지 돌연변이 진단 방법을 이용하여 정상적인 배아만을 선별적으로 이식하여, 유전적으로 이상이 있는 환아를 출산할 확률이 높은 부부에게서 임신과 출산으로 인한 정신적, 육체적 부담을 감소시켜 주고, 정상아를 출산할 수 있도록 하는 것이 본 진단의 목적이다. 현재 예후가 좋지 않은 불임 부부를 대상으로 한 염색체 수적 이상 검사와 단일 유전자 이상 또는 X 염색체 연관 유전 질환의 위험이 있는 부부를 대상으로 착상전 유전진단이 전 세계적으로 널리 시행되고 있으며, 유전 질환에 대한 산전진단 (prenatal diagnosis)을 대체할 수 있는 가장 이상적인 방법으로 생각되고 있다.

과거에 인간의 배아에서 염색체 이상을 진단하는 가장 이상적인 방법은 핵형분석 (karyotyping)으로, 핵형분석을 통하여 염색체 구성에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있었다. 그러나 인간의 착상전 배아에서 핵형분석을 위한 시도가 많았으나, 이용 가능한 세포 즉, 배아당 할구가 1-2개로 제한적이고, 분염법 (banding)에 의한 염색체의 확인이 어렵기 때문에 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다. 이를 개선하기 위하여 여러 가지 분자생물학적 방법들이 고안, 적용되어 현재 착상전 유전진단에 있어서 사용되어지는 진단 방법으로는 크게 형광직접조합법 (FISH, fluorescent in situ hybridization)과 중합효소연쇄반응 (PCR, polymerase chain reaction)이 있다. 형광직접조합법은 주로 염색체 전좌 (translocation) 진단, 성별검사, 염색체 수적 이상 검사에 사용되어지며, 중합효소연쇄반

응은 단일 유전자 이상 진단에 사용되어지고 있다.

현재의 착상전 유전진단의 개념은 Edwards와 Gardner (1968)<sup>1</sup>에 의해 처음으로 도입되었으며, 그 후 착상전 유전진단의 성공적인 임상적응은 1990년 Handyside 등<sup>2</sup>에 의해 최초로 보고되었다. Handyside 등 (1990)은 중합효소연쇄반응 방법을 이용하여 Y 염색체의 특정 부위를 증폭시켜 성별을 구분하는 방법의 착상전 유전진단을 시행하여 건강한 여아의 출생을 보고하였다. 그 이후 착상전 유전진단은 cystic fibrosis<sup>3</sup>와  $\beta$ -globin gene defect<sup>4,5</sup> 같은 단일 유전자 질환에 이용되었다.

최근의 보고에 의하면 현재 전 세계적으로 3000에 이상의 착상전 유전진단을 시행하였으며 이에 따른 임신률은 24% 정도라고 보고되고 있으며 약 1000명 이상의 아이들이 이러한 착상전 유전진단 후 태어났으며 많은 수의 임신이 유지되고 있다.<sup>6</sup> 전 세계적으로 약 40개 기관에서 착상전 유전 진단을 시행하고 있으며, 그 중 4개의 기관 (Chicago, St Barnabas, Bologna, Brussels)이 전체 3000에 중 2774예를 시행하였으며 약 29%의 임신률을 보고하고 있다.<sup>6</sup> 이외에도 미국, 서유럽, 아시아, 호주 등 여러 나라에서 착상전 유전 진단을 시행하고 있으며 앞으로도 점차 늘어날 것으로 예상된다.

우리 나라의 경우도 몇몇의 연구실에서 착상전 유전진단을 시행하고 있지만, 현재까지 보고된 착상전 유전진단의 경우 주로 형광직접조합법을 이용한 염색체의 수적이상이나 구조적 이상이 대부분을 차지하고 있으며, 중합효소연쇄반응법을 사용하여 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단을 시행한 경우는 매우 드물다 할 수 있다.<sup>7-9</sup> 따라서 본 논문에서는 duplex nested PCR 방법을 이용하여 실시한 ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, junctional epidermolysis bullosa (JEB) 그리고 lactic acidosis (LA)에 대한 착상전 유전진단의 결과와 임상적 효용성에 대해 서술하고자 한다.

### 1. Ornithine Transcarbamylase Deficiency

OTC는 mitochondrial matrix에 있는 homotrimeric enzyme으로서 carbamyl phosphate와 ornithine으로부터 citrulline의 합성 과정을 촉매하는 역할을 한다. OTC 유전자는 X 염색체 단완 (Xp21.1)에 위치하며 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성되어 있다. cDNA는 1,062 nucleotide로 이루어져 있으며, 354개의 아미노산을 암호화하고 있다. 이중 32개의 아미노산으로 이루어진 leader sequence는 mitochondrial matrix로 들어가면서 분리되고 최종적으로 322개의 아미노산으로 이루어진 단백질이 기능을 수행한다.<sup>10</sup>

OTC 효소결핍증의 증상은 급성 신생아 고암모니아 혼수상태 (acute neonatal hyperammonemic coma)로부터 비증상 성인 남성까지 매우 다양하게 나타난다. Heterozygous 여성의 80% 정도에서는 증상이 나타나지 않지만 나머지는 부분적인 결핍을 보이는 남성과 비슷한 양상을 보이는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup> 이 유전질환의 경우 X-연관 우성 대사 질환으로 남아의 경우 생후 몇 주안에 hyperammonemia로 인해 사망하며, 대부분의 heterozygous 여성의 경우 어떤 증상도 보이지 않은 경우도 있지만 일부는 육류를 싫어하고 혼수, 실조, 발달 지체, 발작과 혼수를 보이기도 한다.<sup>12,13</sup>

### 2. Junctional Epidermolysis Bullosa

Epidermolysis bullosa는 피부와 점액성 막에 수포가 생기는 유전적 피부질환이다. 이 질환은 피부 기저막 안의 조직분리 정도에 따라 크게 3가지로 구분된다. 첫째, simplex type (EBS)은 keratin 5와 keratin 14 유전자의 돌연변이 때문에 basal keratinocyte안에 분열이 생기는 형태이며, 둘째로는 dystrophic type (DEB)으로 type VII collagen (COL7A1) 단백질로 이루어진 중요한 부착구조인 anchoring fibril에서 lamina densa 아래 부위에서 조직의 분리가 일어나는 형태이다. COL7A1 유전자의 많은 돌연변이가 밝혀져 있으며 이는 열성과 우성의 두가지 형태로 유전되는 것으로 알려져 있다. 마지막으로 셋째는 junctional type (JEB)으로 lamina lucida의 진피-표피 기저막에서 수포가 형성되는 형태를 보이며 미세구조상 hemidesmosome-anchoring filament complex에서의 이상도 관찰된다. 이런 JEB type의 환자에서는 laminin  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 3$  chain으로 알려진 laminin 5라는 anchoring filament protein의 subunit chain을 만드는 3가지 유전자의 돌연변이가 많이 밝혀져 있다. 또한 원인 단백질 중 하나인 integrin  $\beta 4$ 는 integrin  $\alpha 6$ 와 결합하여 integrin  $\alpha 6/\beta 4$  heterodimer을 이루고 이는 laminin과 상호작용을 통하여 hemidesmosome의 형성과 유지에 관여한다.

임상적으로는 2000년 Cserhalmi-Friedman 등<sup>14</sup>이 2명의 환자를 대상으로 5번의 IVF cycle을 시술하여 JEB의

Herlitz type에 대한 착상전 유전진단을 시행하였으나 임신은 되지 않은 것으로 보고되었다.

### 3. Lactic Acidosis

Lactic acidosis는 소아시기에 자주 발병되는 대사이상 질환으로서 주요 원인으로 밝혀진 것은 pyruvate dehydrogenase (PDH) complex의 이상이 대부분이다. 이 PDH complex deficiency를 보이는 환자의 임상적 특징은 매우 다양하여 간혈성 실조로부터 정신지체와 신경학적 문제 또는 신생아 시기에 심각한 lactic acidosis와 조기 사망으로 나타나는 점진적 질환이다. 이런 PDH complex deficiency 원인의 대부분은 PDH complex 구성 단백질 중의 하나인 pyruvate dehydrogenase (E1)  $\alpha$  subunit (PDHA1) 유전자의 돌연변이에서 기인하는 것으로 알려져 있다.

E1  $\alpha$  (PDHA1) 유전자는 여러 연구실에서 거의 동시에 밝혀졌으며,<sup>15-18</sup> 보고된 바로는 약 1.5 kb로 이루어져 있으며 그 단백질은 29개의 아미노산으로 이루어진 mitochondrial targeting sequence를 포함한 390개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이 유전자는 11개의 exon으로 이루어져 있으며 약 17 kb의 DNA에 걸쳐 있으며 X 염색체의 단완 (Xp22.1)에 위치하고 있다. 또한, E1  $\alpha$  유전자에서의 돌연변이는 대부분 de novo로 발생하는 것으로 보고되고 있다.<sup>19</sup> 현재까지 알려진 E1  $\alpha$  유전자의 돌연변이를 조사해 보면 삽입이나 결실 돌연변이의 경우 주로 exon 10이나 11에서 많이 일어나며 반대로 missense나 nonsense 돌연변이의 경우 exon 2를 제외한 모든 exon에서 다양하게 발생한다고 알려져 있다.<sup>19</sup>

본 논문에서는 duplex nested PCR과 direct sequencing 또는 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석 방법을 이용하여 3 가지의 각각 다른 유전 질환을 가지고 있는 부부에서 시행한 착상전 유전진단의 임상 적용에 대하여 보고하고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. Patients

#### 1) Ornithine Transcarbamylase Deficiency

대상 부부는 29세 때 첫 아기를 분만하였으나 신생아의 혈중 암모니아 농도가 정상치의 5배 이상 상승하여 경련을 일으켰고 생후 7일 만에 신생아가 사망하였다. 서울아산병원 의학유전학 클리닉 및 검사실에서 유전자 검사를 시행한 결과 OTC 효소결핍증 (R320X)으로 진단되었다. 두 번째 자연임신의 용모막 생검에서 OTC 효소결핍증을 진단받고 치료적 유산수술을 시행하였다. 그 후 세 번째 임신은 착상전 유전진단을 시도하기 위해 본

삼성제일병원으로 전원되었다. 우선 부부의 유전진단을 위해 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하여 *ornithine transcarbamylase* 유전자의 exon 9을 조사하여 본 결과 R320X의 돌연변이를 재확인할 수 있었다 (Fig. 1). OTC deficiency는 X 염색체 연관 co-dominant 질환으로 보인자 여성에서도 발현될 수 있기 때문에 single cell PCR 방법으로 진단 시 오진의 가장 큰 원인으로 알려져 있는 allele drop out (ADO) 가능성을 최대한 배제하기 위하여 FISH를 이용한 X, Y, 18 염색체 분석과 *SRY* 유전자의 분석을 하였다. OTC 유전자의 exon 9의 돌연변이 진단을 위해 duplex nested PCR 방법을 사용하여 증폭한 후 RFLP 분석 방법을 통해 OTC exon 9의 돌연변이 유무를 확인하였으며 FISH와 duplex nested PCR 방법의 결과를 종합하여 최종적인 진단을 하였다.

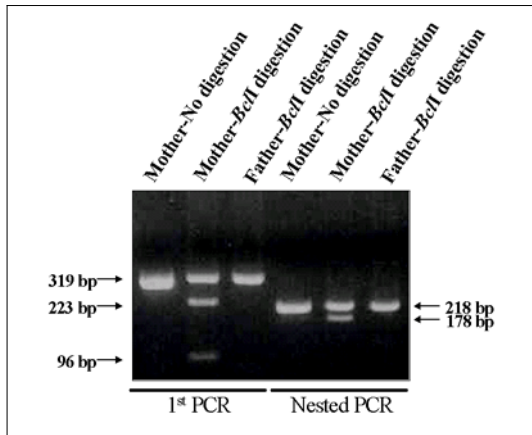


Fig. 1. Identification of the maternal mutation (heterozygote type) in exon 9 of the *OTC* gene. After restriction enzyme digesting the PCR product with *BclI*, the 319 or 218 bp PCR products of the affected mother were digested into 223 and 96 bp (lane 2) or 179 and 40 bp products (lane 5), respectively. Lane 1 and 4, the first and nested PCR products of the affected mother, respectively; lane 2 and 5, *BclI*-digested products from the first and nested PCR products of the affected mother, respectively; lane 3 and 6, *BclI*-digested products from the first and nested PCR products of the normal father, respectively.

## 2) Junctional Epidermolysis Bullosa

본 부부의 경우 첫 임신 당시 정상분만을 통해 여아를 출산하였으나 23개월 만에 수포성 표피박리증으로 사망하였으며, 그 후 네 번의 임신 경험이 있었으나 출산 후 사망하거나 양수검사와 융모막검사를 통해 돌연변이가 발견되어 치료적 유산수술을 시행하였고 착상전 유전진단에 의한 임신을 위해서 본원에 내원하였다. 이들 부부

의 질환 원인은 17번 염색체에 위치하고 있는 *integrin  $\beta 4$  (ITGB4)*에서의 돌연변이로 밝혀졌으며 부부가 각각 서로 다른 위치에 1개씩의 돌연변이를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 여성의 경우 *ITGB4* exon 7에서 nucleotide C가 삽입 (601insC)되어 frameshift가 발생하며 결국 premature termination되는 돌연변이였으며, 남성의 경우 같은 유전자의 exon 11에서 nucleotide A가 C (1274A>C)로 치환되어 glutamine이 proline으로 바뀌는 돌연변이 (Q425P)를 가지고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 이들 부부 각각 *ITGB4* 유전자에 돌연변이를 가지고 있었기 때문에 *ITGB4* exon 7번과 11번을 역시 duplex nested PCR 방법으로 증폭시킨 후 direct sequencing방법으로 진단을 하였다.

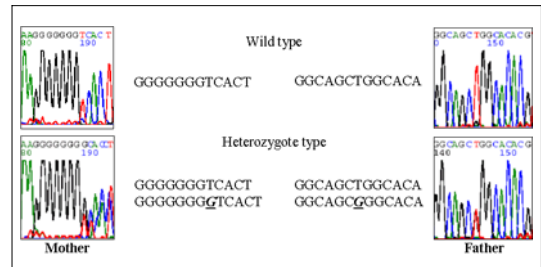


Fig. 2. Detection of the maternal (underlined G insertion) and paternal mutations (underlined G substitution) in the exon 7 and 11 of the *ITGB4* in the EB case, respectively.

## 3) Lactic Acidosis

대상 부부는 내원 당시 35세로 lactic acidosis로 진단 받은 아들이 있었다. 이들 부부와 아들의 혈액으로부터 DNA를 추출하여 유전자 검사를 시행하여 본 결과 X 염색체에 위치하고 있는 *PDH1* 유전자에 돌연변이가 있었으며, 남편은 정상, 부인은 *PDH1* 유전자의 1163-1166 위치에 1159-1162의 4-bp (AAGT)가 중복되면서 삽입된 형태의 보인자이었으며 그의 아들은 모계의 돌연변이가 있는 비정상 X 염색체가 유전된 것으로 판명되었다 (Fig. 3). 유전자 내의 4-bp 삽입 유무를 진단하기 위해 *PDH1* exon 11과 *SRY* 유전자를 duplex nested PCR을 이용하여 증폭시킨 후 *PDH1* exon 11의 산물로 direct sequencing을 수행하여 4-bp 삽입 유무를 확인하였다.

## 2. Genomic DNA의 분리와 single lymphocyte preparation

각각의 부부와 질환이 있는 아들의 혈액을 EDTA가 들어 있는 vacum tube에 5 mL씩 채혈한 후 원심분리하여 buffy coat만을 분리한 후 AquaPure Genomic DNA kit



Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions for duplex nested PCR of the 3 different PGD cases

Name	Sequences	Annealing temp.	Product sizes
Ornithine transcarbamylase deficiency			
Ornithine transcarbamylase Ex 9	CACTCTGCTCCTTTGTCTCT	62	319
	GTTGGAACCACACAAAGAAC		
Ornithine transcarbamylase Ex 9-nested	GGCCATGTGTGTTTTAGAT	64	218
	GTCCACTTTCGTTTTCTGC		
Epidermolysis bullosa			
Integrin $\beta 4$ Ex 7	CGTCTTCCCCTGTGACACTC	61	274
	CCTTGCCCAGAAGTGCTC		
Integrin $\beta 4$ Ex 7-nested	CTCTCTCTCCCTCCACCTC	66	194
	ACACAGCTGTCTGCAGGATG		
Integrin $\beta 4$ Ex 11	TCGATGGCCCCCTGGTCCTT	61	274
	CCTGGGTGCTTGGCTCAGCT		
Integrin $\beta 4$ Ex 11-nested	CCCTTGAGCACGTGGATG	66	185
	GGTGCTTGGCTCAGCTCTC		
Lactic acidosis			
Pyruvate dehydrogenase $\alpha 1$ Ex 11	TTGGTACCTAAGCTGCTGTTC	62	380
	GGCATAAGGAATTGTTCTTCC		
Pyruvate dehydrogenase $\alpha 1$ Ex 11-nested	CTGAGCCACCTTTGGAAGAG	66	187
	TGACTGGGTTTTCTTCTCCT		
Sry	GAATATTCCCGTCTCCGGA	64	472
	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG		

## 6. 형광직접 보합법

보다 정확한 착상전 유전진단을 위해 OTC deficiency의 경우 형광직접보합법을 병행하여 실시하였다. Biopsy된 할구는 0.5% sodium citrate 용액에서 5분간 처리한 다음 slide glass로 할구를 옮겨 공기 중에서 건조시킨 후 해부현미경 하에서 관찰하면서 고정액 (Carnoy's solution, methanol: acetic acid=3:1)을 떨어뜨려 할구의 핵을 고정하였다. 고정액을 완전히 건조시킨 후, 잔여 세포질을 제거하기 위하여 0.01% pepsin의 0.01 N HCl 용액을 5분간 처리하였다. 증류수와 PBS로 수세한 후 1% paraformaldehyde 용액으로 10분간 고정하고 PBS와 증류수로 수세하였다. 고정 후 70, 85, 100% ethyl alcohol로 탈수, 건조시키고 X, Y, 그리고 18번 염색체에 대한 형광 probe (CEP X Spectrum Orange, CEP Y Spectrum Green and CEP 18 Spectrum Aqua, Vysis, USA)로 37℃에서 16시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 후 42℃

에서 50% formamide/2X SSC, 2X SSC로 세척하였고, 다시 2X SSC/0.1% nonident P (NP)-40 buffer로 상온에서 세척하였다. 그 후 DAPI가 첨가된 antifade mounting solution (Vysis, USA)으로 10분간 DNA를 염색한 후 형광 현미경 (Optiphot-2, Nikon, Japan)으로 형광직접보합법의 signal을 관찰하였다.

## 7. Restriction fragment length polymorphism analysis

OTC deficiency에 대한 착상전 유전진단의 경우 돌연변이 여부를 restriction fragment length polymorphism 방법을 사용하여 진단하였다. Nested PCR 산물을 *BclI* 제한 효소 (New England Biolabs Inc., MA, USA)로 50℃에서 2시간 처리한 후 2% agarose gel에 전기영동하여 그 산물을 UV 하에서 관찰하였다.

## 8. Direct DNA sequencing

Direct sequencing을 위해 먼저 nested PCR 산물을 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Sciences, USA)을 이용하여 정제하였다. Sequencing 반응은 8  $\mu$ l의 Terminator Ready Reaction Mix (BigDye Terminator Reaction Kit; Applied Biosystems, USA), 10-20 ng의 DNA template, 1.6 pmol의 sequencing primer와 증류수를 혼합하여 최종 20  $\mu$ l로 만들었으며 96°C에서 30초, 50°C에서 15초, 그리고 60°C에서 4분의 cycle을 25회 반복 수행하였다. Sequencing 반응산물에 2  $\mu$ l의 3 M sodium acetate (pH 4.6)와 50  $\mu$ l의 ethanol을 넣어 섞은 후 상온에서 15분간 방치하였다. 그 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 그 pellet을 다시 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 다음 20  $\mu$ l의 Hi-Di formamide (Applied Biosystems, USA)로 녹였다. 그 다음 90°C에서 5분 동안 denaturation 시킨 후 automatic genetic analyzer (ABI Prism3100-Avant, Applied Biosystems, USA)를 이용한 capillary electrophoresis와 Seqscape software (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 DNA 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

### 1. Ornithine transcarbamylase deficiency

이 부부의 경우 남편은 정상이었으나 부인에게서 돌연변이가 확인되었다. X 염색체에 있는 *ornithine transcarbamylase* 유전자 exon 9의 R320X 돌연변이와

*SRY* 검사를 위해 duplex nested PCR을 수행하였다. 이는 OTC 효소결핍증의 경우 여성이 보인자일 경우에도 질병이 발생하고 사망할 수 있기 때문에 *SRY* 검사를 병행하였다. 착상전 유전진단을 시행하기 이전에 환자의 single lymphocyte로 실시한 duplex nested PCR 예비 실험 결과 amplification rate와 ADO rate는 각각 42/46 (91.3%)와 4/30 (13.3%)로 확인되었다. 총 18개의 난자를 회수하여 17개를 대상으로 세포질내 정자주입술을 수행하였으며 그 중 11개의 수정란이 확인되었다. 11개의 배아 중 2개의 수정란은 할구를 1개씩 생검하여 duplex nested PCR을 수행하였고 나머지 9개의 수정란은 할구를 2개씩 생검하여 한 개는 duplex nested PCR, 나머지 한 개의 경우 X, Y, 그리고 18번 염색체에 대한 수적 이상 검사를 위해 형광직접조합법을 수행하였다. 일차적으로 duplex nested PCR의 경우 11개 중 1개는 amplification failure (9.1%)를 나타내었고 나머지 10개가 증폭되었으며 이들을 대상으로 *BclII* 제한효소를 이용한 RFLP 분석을 수행하여 4개의 정상 배아를 확인하였다 (Fig. 4). 그러나 CEP X Spectrum Orange, CEP Y Spectrum Green과 CEP 18 Spectrum Aqua를 사용하여 시행한 형광직접조합법의 결과 (data not shown)에서 4개 중 1개는 18번 염색체 trisomy, 1개는 18번 염색체 monosomy, 1개는 정상 또는 보인자 형태의 배아, 나머지 한 개는 정상 배아로 확인되어 이 한 개의 배아만을 이식하였다. 그 후 임신 검사 결과 임신으로 확인되었으며, 17주 후 양수 검사에서 태아가 정상 남아임을 확인하였다 (Table 2). 최근 임신 36주 만에 제왕절개를 시행하여 2.8 kg의 건강한 남아를

Table 2. Clinical outcomes of the PGD for 3 different single gene disorders

	Ornithine transcarbamylase deficiency	Epidermolysis bullosa	Lactic acidosis
No. of oocytes	18	17	15
No. of injected oocytes	17	15	9
No. of fertilized oocytes	11	13	8
No. of biopsied embryos (blastomeres)	11 (20)	10 (19)	5 (5)
No. of analyzed embryos	10	10	4
No. of normal embryos	1	3	1
No. of normal or heterozygous female embryos	2	0	1
No. of affected embryos	7	7	2
No. of transferred embryos	1	3	1
Pregnancy	Yes	No	No
Amniocentesis	Normal	-	-
Birth weight/Gest. wks. at delivery	2.8 kg/36 wks	-	-



분만하였다. 아기로부터 혈액을 채취하여 유전검사를 시행한 결과 정상으로 진단되었으며, 혈액 내 암모니아 수치 역시 정상범위에 속하는 것으로 확인되었다.

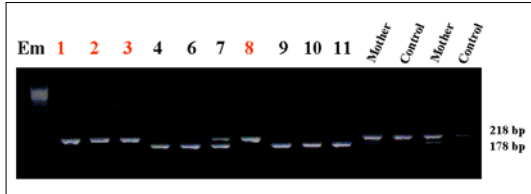


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *Bcl*I restriction enzyme in the PGD for OTC deficiency. In normal embryo (No. 1, 2, 3 and 8), the 218 bp PCR products were not digested with *Bcl*I.

## 2. Junctional Epidermolysis Bullosa

이 부부의 경우 같은 유전자 (*ITGB4*)에 서로 다른 돌연변이가 있어 세포 하나 당 두 가지의 돌연변이 (*ITGB4* 601InsC와 1274A>C)를 검사해야 했기 때문에 duplex nested PCR 방법을 이용하였다. 착상전 유전진단을 시행하기 이전에 환자의 single lymphocyte로 실시한 duplex nested PCR 예비 실험 결과 amplification rate는 166/173 (96.0%), ADO rate는 23/132 (17.4%)로 나타났다. 총 17개의 난자를 채취하여 15개의 성숙된 난자에서 세포질내 정자주입술을 이용하여 13개가 수정란을 얻었다. 이 중 10개의 배아를 대상으로 생검하였으며 1개의 배아를 제외하고 나머지 9개의 배아에서는 2개씩의 할구를 생검하여 총 19개의 할구를 대상으로 duplex nested PCR을 수행하였다 (Table 2). 유전자 증폭과정에서 1개 (5.2%)의 시료에서 amplification failure를 보였으며 나머지 18개의 PCR 산물을 이용하여 direct sequencing을 수행하였다. 정상으로 판정된 세 개의 배아를 이식하였으나 임신은 이루어지지 않았다.

## 3. Lactic Acidosis

X 염색체에 있는 *PDHAI* 유전자 exon 11의 4-bp 삽입이 이 질환의 원인이었기 때문에 성별검사와 *PDHAI* 유전자에 대한 정상 유무를 진단하였다. 임신에 직접 적용하기 이전에 환자의 single lymphocyte를 대상으로 시행한 예비 실험 결과 87.7% (93/106)의 amplification rate와 19.0% (4/21)의 ADO rate를 보였다. 이 환자의 경우 총 5개의 배아에 대하여 할구 생검을 실시하였으며, 그 중 1개는 생검 시 핵이 관찰되지 않은 배아였으며 또 하나는 여러 개의 핵을 가지고 있는 배아였다. 일차적으로 duplex nested PCR로 *SRY*와 *PDHAI* exon 11을 증폭하였으나 1개의 할구에서는 *SRY*만 증폭되고 *PDHAI* exon 11

은 증폭되지 않았다 (Fig. 5). 따라서 4개의 할구에 대해서만 direct sequencing 수행하여 2개의 정상 배아를 확인할 수 있었으나, 이 사례의 경우 예비 실험 결과 19%의 높은 ADO rate를 나타내었기 때문에 여성 배아의 경우 실제로 X 염색체상의 heterozygote임에도 불구하고 single cell PCR을 이용한 착상전 유전진단 결과 정상으로 관찰되는 ADO에 따른 오진의 가능성을 배제하기 위하여 정상 남성 배아 1개만을 이식하였다. 그 후 12일 후  $\beta$ -hCG를 측정하여 임신여부를 확인하였으나 임신은 되지 않았다 (Table 2).

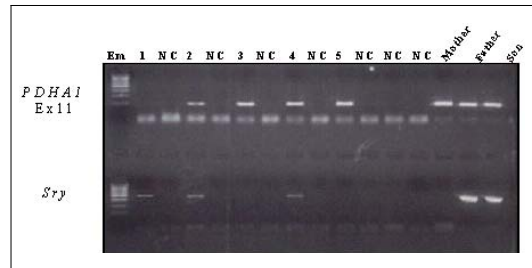


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis after a PGD cycle for lactic acidosis due to pyruvate dehydrogenase deficiency using duplex nested PCR. The PCR products of *PDHAI* exon 11 and *Sry* were detected in embryo 2, 3, 4, 5 and embryo 1, 2, 4, respectively. There was no PCR products in all negative controls.

## 고 찰

착상전 유전진단 (PGD)은 현재 산전 진단 (prenatal diagnosis)을 대신할 수 있는 유용한 방법으로서 또한 비윤리적인 유산을 피할 수 있는 방법으로서 세계 여러 나라에서, 여러 가지 질병을 대상으로 시행되어지고 있으며 지금까지 수많은 부부들에게 정상아를 출산할 수 있는 기회를 제공하여 주었다.

착상전 유전진단이 처음 도입되었을 당시에는 핵형분석을 통하여 단지 염색체 구조적 이상이라든가 수적 이상에 대한 정보만을 이용하여 정상 혹은 보인자의 가능성이 있는 배아의 이식을 시도하였으며 정확한 염색체의 확인이 불가능하기 때문에 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다. 착상전 유전 진단에 있어서 사용되어지는 형광직접조합법 (FISH) 외에 중합효소연쇄반응 (PCR)을 이용한 착상전 유전진단 역시 여러 가지 문제점으로 인하여 처음 PCR 방법을 적용한 진단에서는 그 결과가 비효율적이거나 명확하지 않은 경우가 많았다. 그러나 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 nested PCR이라든가 multiplex PCR 등 여러 가지 방법들이 고안되어 행해졌



으며 그 외에도 Taq polymerase의 다양화, cell lysis 방법의 발전, 여러 가지 PCR 조건의 개선 등 다방면에서 발전이 이루어짐에 따라 현재에는 높은 PCR 특이성과 낮은 ADO rate를 나타내는 조건이 확립되어 PCR을 이용한 착상전 유전진단의 신뢰성을 높이는데 크게 기여하고 있다.<sup>20,21</sup> 또한, 사람의 genome project가 진행되어 대부분의 유전자에 대한 염기 서열과 그 기능이 밝혀짐에 따라 질병을 유발하는 유전자에 대한 연구가 용이해졌으며, 각 유전자의 linked marker 연구가 활발히 진행되어 착상전 유전진단에서의 이러한 marker 이용은 misdiagnosis를 일으키는 원인 중 하나인 ADO rate를 감소시키기 위한 해결 방안으로 널리 사용되고 있다.

본 논문의 연구 결과는 국내에서 처음으로 임신 및 출산에 성공한 특정 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단이며 전 세계적으로도 흔하지 않은 사례라 할 수 있다. 전체 35개의 single blastomere를 분석하였으며 그 중 2개의 할구 시료에서 PCR amplification failure를 보여 5.7% (할구 생검시 핵이 관찰되지 않은 할구 1개 포함)의 amplification failure rate를 나타내었다. 또한 모든 실험에서 동시에 실행되었던 negative control tube에서는 어떠한 PCR 산물도 관찰되지 않았고 positive control tube에서는 예상했던 PCR 산물이 관찰되어 PCR 과정에서 오류가 없었음을 증명하였다. 따라서 최종적으로 진단 가능했던 배아는 24개 (92.3%)였으며, 그 중 정상으로 진단된 5개의 배아를 이식하여 3쌍의 부부 중에서 OTC deficiency 부부에서만 임신이 확인되었으며, 임신 17주에 양수 검사를 통하여 확인해 본 결과 정상으로 확인되어 착상전 유전진단이 정확했음을 확인할 수 있었다. 분만 후 건강한 남아에서 혈액을 채취, 분석하여 유전자 변이의 정상 여부를 최종 확인하였다.

최근 단일 유전자 돌연변이 분석을 통한 착상전 유전자 진단의 새로운 적용사례들이 발표되고 있다.<sup>22</sup> 이러한 적용사례들은 기존의 산전 진단을 원하지 않거나 아니면 인공유산에 피하기 위해 착상전 유전진단을 시행하려는 부부들 이외에 암 유발 유전자라든가 Alzheimer's disease 같은 late-onset disorder를 유발하는 유전자에 대한 돌연변이를 사전에 차단하기 위하여 착상전 유전진단을 도입하는 경우, Fanconi anaemia 같은 질병을 가지고 있는 아이에게 haematopoietic stem cell을 이식해 주기 위해 그 다음 아이는 질병이 없는 아이를 출산하거나 첫째 아이와 HLA type을 맞추어 출산하고자 하는 경우, 그 외에도 성별 검사를 통해 아이를 출산하고자 하여 착상전 유전진단을 시행하는 사례 등을 포함하고 있다. 그러나 이러한 광범위한 사례들은 사회적 윤리적 문제를 야기할 수 있으므로 이에 대한 적절한 논의가 있어야 할 것으로 사료된다.

현재까지 진행된 착상전 유전진단 사례에서 볼 수

있듯이 좀 더 많은 수의 배아를 진단하고 또한 misdiagnosis를 최소한으로 줄이기 위해 여러 가지 문제점의 해결 방안이 제시되었다. 첫째로는 contamination 문제이다. 이를 해결하기 위해 각각의 PCR 시약들을 개별적으로 구분하여 사용한다든가 아니면 조금씩 분주하여 사용함으로써 시약의 낭비 및 contamination을 줄일 수 있으며, 또한 양질의 filter tip을 사용하고 PCR 반응 장소를 청결히 유지함으로써 contamination을 감소시킬 수 있다. 둘째로는 PCR 반응의 특이성 문제이다. 이를 해결하기 위해 여러 PGD 연구실에서 nested PCR방법을 사용하고 있으며 본 연구에서도 이를 이용하였다. 또한, 최적의 PCR 조건을 찾기 위해 착상전 유전진단 전에 lymphocyte와 같은 단일세포를 이용하여 충분한 예비 실험을 시행하는 것이 필수적이다. 셋째로는 ADO 문제이다. 이의 해결을 위해 여러 가지 방면에서의 노력이 시도되고 있다. Cell lysis의 효율성을 높이기 위해 alkaline lysis 방법과 proteinase K를 이용하는 방법들을 적용하여 ADO rate를 감소시킬 수 있다고 보고되었다. 또한 PCR 초기 cycle에서의 denaturation temperature라든가 반응시간을 증가시키는 시도가 있었으며, 최근 발표된 논문에 의하면 온도보다는 시간을 증가시킴으로써 ADO rate를 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다.<sup>20</sup> 마지막으로 심한 preferential amplification의 경우 일반 mutation 확인 방법으로 확인할 수 없지만 fluorescent PCR 방법을 사용할 경우 이를 구분할 수 있어 ADO rate를 현저히 줄일 수 있다. 이외에도 multiplex PCR 방법을 사용한다든가 두 개의 할구를 생검한다든가 아니면 적절한 polymorphic marker를 사용하여 궁극적으로 ADO rate를 감소시킬 수 있다.

본 연구에서 삼성제일병원 착상전 유전진단팀은 duplex nested PCR 방법을 이용하여 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단을 성공적으로 수행하여 국내 최초로 OTC deficiency 가계에서 정상적인 남아의 출산을 확인하였다. 현재 국내 단일유전자 이상 질환을 위한 착상전 유전진단 분야는 초기 단계이며 앞으로 위에서 언급한 여러 가지 문제점들을 개선해 나가기 위해 좀 더 많은 노력이 필요할 것이라 생각되어진다. 이러한 문제점들을 성공적으로 극복해 나간다면 유전 질환을 갖는 아이를 출산할 위험이 있는 부부들이 반복적으로 겪어야 하는 정신적, 육체적 고통을 줄여 줄 수 있을 것이며, 이들에게 정상아를 출산할 수 있는 더 많은 기회를 제공할 것이라 생각된다.

- 참고문헌 -

1. Edwards RG and Gardner RL. Choosing sex before birth. New Scientists 1968; 38: 218-20.

2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
3. Coutelle C, Williams C, Handyside H, Hardy K, Winston R, Williamson R. Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *Br Med J* 1989; 299: 2-24.
4. Holding C and Monk M. Diagnosis of beta thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse preimplantation embryos. *Lancet* 1989; ii: 532-5.
5. Pickering S, McConnell J, Johnson M, and Braude P. Reliability of detection by polymerase chain reaction of the sickle-cell containing region of the  $\beta$ -globin gene in single human blastomeres. *Hum Reprod* 1992; 7: 630-6.
6. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium Steering Committee. 2002. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002; 17: 233-46.
7. 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수, 백은찬 등. 근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자진단. *대한불임학회지* 1996; 23: 109-14.
8. 임천규, 한미현, 전진현, 송건지, 김정옥, 박소연 등. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접 조합법을 이용한 착상전 유전자진단의 임상적 적용. *대한산부학회지* 2000; 43: 1147-53.
9. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29: 269-78.
10. Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I. Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. *J Biochem* 1988; 103: 302-8.
11. Batshaw ML, Msall M, Beaudet AL, and Trojak J. Risk of serious illness in heterozygotes for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Pediatr* 1986; 108: 236-41.
12. Ray PF, Gigarel N, Bonnefont JP, Attie T, Hamamah S, Frydman N, et al. First specific preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1048-54.
13. Brusilow SW and Horwich AL. Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs Kinzler Vogelstein, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill 2000. p1909-63.
14. Cserhalmi-Friedman PB, Tang Y, Adler A, Krey L, Grifo JA, Christiano AM. Preimplantation genetic diagnosis in two families at risk for recurrence of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 2000; 9: 290-7.
15. Dahl H-HM, Hunt SM, Hutchison WM, Brown GK. The human pyruvate dehydrogenase complex: isolation of cDNA clones for the E1  $\alpha$  subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA. *J Biol Chem* 1987; 262: 7398-403.
16. De Meirleir L, MacKay N, Lam Hon Wah AM, Robinson BH. Isolation of a full-length complementary DNA coding for human E1  $\alpha$  subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 1991-5.
17. Ho L, Wexler ID, Liu T-C, Thekkumkara TJ, Patel MS. Characterization of cDNAs encoding human pyruvate dehydrogenase  $\alpha$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5330-4.
18. Koike K, Ohta S, Urata Y, Kagawa Y, Koike M. Cloning and sequencing of cDNAs encoding  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human pyruvate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 41-5.
19. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, Liebaers I, Brown GK, Brown RM, et al. Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1)  $\alpha$  subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mut* 2000; 15: 209-19.
20. Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, and Wells D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 411-20.
21. Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2003; 8: 11-20.
22. Robertson JA. Extending preimplantation genetic diagnosis: the ethical debate Ethical issues in new uses of preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod* 2003; 18: 465-71.

=국문초록=

**목적 :** 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis: PGD)은 체외수정에서 획득한 수정란으로부터 할구를 분리한 후 염색체 또는 유전자 검사를 통해 정상적인 배아만을 선별적으로 자궁에 이식함으로써 유전적으로 이상이 있는 환아를 출산할 확률이 높은 부부들에서 환아의 임신과 출산을 예방할 수 있다. 본 연구에서는 체외수정을 통해 얻어진 배아에서 하나 혹은 두개의 할구를 분리하고, duplex nested PCR 방법을 사용하여 특정 유전자에 대한 이상 유무를 확인한 후 정상적인 배아만을 이식하여 임신과 출산에 성공한 사례를 보고하고자 한다.

**연구 방법 :** 특정 유전자의 이상이 확인된 ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, junctional epidermolysis bullosa (JEB), lactic acidosis (LA)에서 착상전 유전진단을 수행하였다. 전체적으로 26개의 배아에서 할구 생검하여, OTC deficiency와 LA 사례의 경우 돌연변이가 있는 유전자 부위와 Y 염색체의 SRY를, EB 사례의 경우 돌연변이가 있는 유전자의 서로 다른 두 부위를 동시에 확인하기 위해 duplex nested PCR 방법으로 각 유전자를 증폭한 후 agarose 전기영동법과 염기서열분석 또는 제한효소를 이용한 RFLP 방법으로 특정 유전자의 이상 유무를 판정하였다.

**결과 :** 전체 배아 중 92.3% (24/26)에서 성공적인 유전자 분석이 가능하였으며, 그 중 정상으로 판정된 5개 (19.2%)의 배아를 각각의 사례에서 이식하였다. 그 결과 OTC deficiency 부부에서 임신이 되었으며 임신 17주에 실시한 양수 검사에서 태아가 정상임을 확인하였고, 36주에 정상남아를 분만하였다. 아기로부터 혈액을 채취하여 유전검사를 시행한 결과 정상으로 확인되었다.

**결론 :** 본 연구의 성공적인 결과는 유전병 가계에서 특정 유전자에 대한 착상전 유전진단에 의해 정상아를 분만한 국내 최초의 보고로 생각된다. 이러한 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단은 현재 치료가 어려운 여러 가지 유전병들에 적용이 가능하며, 이러한 질환을 가지고 있는 많은 부부들에게 정상적인 아이를 가질 수 있는 기회를 제공해 줄 것이다.

**중심단어 :** 단일유전자 이상 질환, 착상전 유전진단, Ornithine transcarbamylase deficiency, Junctional epidermolysis bullosa, Lactic acidosis